

Actividades hidrolíticas y caracterización isoenzimática de poblaciones microbianas aisladas del patrimonio documental del Archivo General de Colombia

Luz Stella Villalba MSc.¹, José Fernando Mikán Ph.D² y Jimena Sánchez MSc.³

¹Laboratorio de análisis y control, Archivo de Bogotá - ²Facultad de Medicina, Universidad Militar Nueva Granada -³ Departamento de biología, Universidad Nacional de Colombia

Recibido:08-06-2004 Aceptado:29-09-2004

Resumen

Este trabajo presenta un modelo para el aislamiento y evaluación de microorganismos agentes deteriorantes del acervo documental. Se recuperaron e identificaron 28 aislamientos tanto de las unidades de conservación con biodeterioro como de la atmósfera del depósito 15 del Archivo General de la Nación de Colombia (AGN). De este grupo, 16 aislamientos microbianos mostraron capacidad hidrolítica sobre fibras vegetales cuando se cultivaron en medios con paredes celulares al 1% como única fuente de carbono. A las poblaciones microbianas recuperadas se les evaluó su capacidad para hidrolizar celulosa, xilano, almidón y proteínas, considerando los halos de degradación y el número de sustratos hidrolizados, se seleccionaron cuatro aislamientos: dos de *Penicillium* sp., uno de *Bacillus* sp. y uno de *Actinopolyspora* sp. A los aislamientos se les cuantificó las actividades depolimerasas y accesorias y se les determinó el perfil isoenzimático para celulasas y xilanasas. Los resultados sugieren: (i) los hongos filamentosos y actinomycetes son más eficientes en la degradación de polímeros complejos, (ii) posiblemente las poblaciones bacterianas actúan como colonizadores secundarios y (iii) el perfil isoenzimático permite descartar microorganismos saprófitos, de especializados en degradar soporte celulolítico.

Palabras claves: biodeterioro, poblaciones microbianas, hidrólisis, isoenzimas, acervo documental, polímero complejo.

Abstract

Hydrolytic activity and isoenzymatic characterization of microbial population Isolated of documental Heritage of General Archive of Colombia (AGN).

This work shows an isolation and evaluation model of microorganisms deterioration agents of documental heritage. 28 Isolations were recovered and identified as conservation with biodeterioration as in deposit No. 15 atmosphere of AGN (Bogotá-Colombia). Of this group, 16 microbial isolations showed hydrolytic capability on vegetable fibers when they were cultivated in with cellular walls at 1% as the unique carbon source. In the recovered microbial populations were evaluated the capability to hydrolyze cellulose, xylane, almidon and

protein. Taking into account degradation haloes and the number of hydrolyzed substrates were selected four isolations: two of *Penicillium* sp., one of *Bacillus* sp. and one of *Actinopolyspora* sp.. Polymerase activities and accessories were quantified on them and it was determined Isoenzymatic profile to cellulase and xylanase. The results suggest: filamentous fungi and Actinomycete are more efficient degradation complex polymer (cellulose), probably the bacterial population acts as a secondary settler and Isoenzymatic profile permits discard saprophyte microorganisms, specialized in degrading cellulolytic support.

Key Words: biodeterioration, microbial population, enzymatic hydrolytic, Isoenzyme.

Introducción

El acervo documental considerado de interés nacional, custodiado en archivos o museos, está expuesto permanentemente a sufrir alteraciones físicas, químicas y/o biológicas. Los deterioros biológicos, causados por los microorganismos como consecuencia de colonizaciones puntuales y de la utilización del papel como fuente de carbono y energía, ocasionan cambios no deseados en las propiedades del material. En la colonización y degradación del soporte papel, interactúan las diferentes pobla-

ciones microbianas, bacterias, hongos y actinomicetes, el papel compuesto de fibras vegetales, aditivos funcionales (encolantes, carga, abrillantadores ópticos, agentes consolidantes) y tintas con aglutinantes orgánicos, es vulnerable a factores abióticos y bióticos. Los microorganismos, principales agentes bióticos utilizan el papel como fuente nutricional, haciendo uso de sus complejos sistemas enzimáticos (glucanasas y proteasas), ayudados por las condiciones micro y macroclimáticas del ambiente.

Esta investigación evaluó el compromiso de las diferentes poblaciones de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetes) en la degradación del material, estudiando sus actividades hidrolíticas y perfil

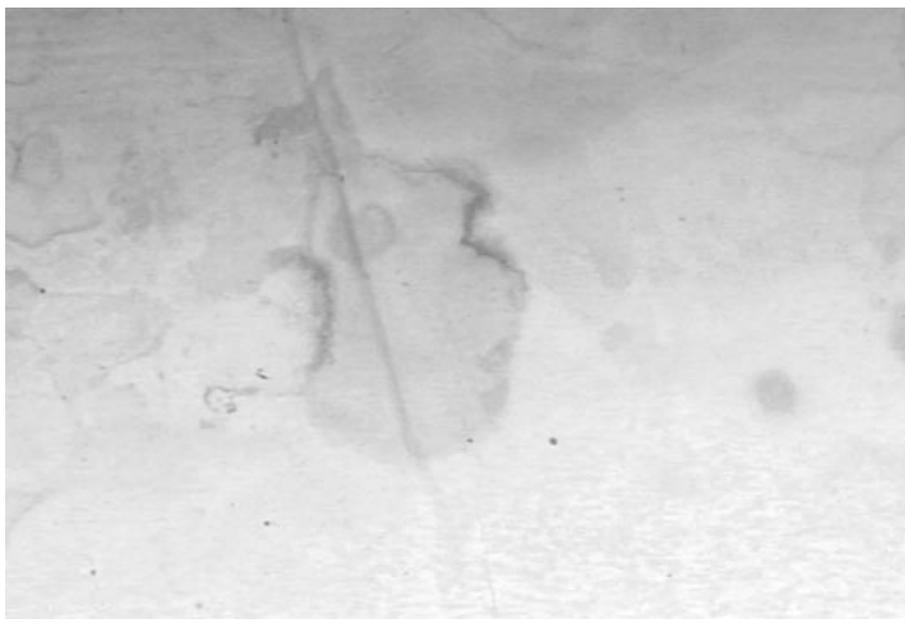


Figura 1. Indicadores de biodeterioro documental.

isoenzimático. Para ello, se recuperaron e identificaron las diferentes poblaciones microbianas cultivables a partir de la atmósfera y de las unidades de conservación con biodeterioro, se evaluó la capacidad hidrolítica de los microorganismos, se caracterizó parcialmente los complejos isoenzimáticos por isoelectroenfoco (IEF) y se analizó la relación entre los microorganismos estudiados y su acción hidrolítica, como factores determinantes en el proceso de biodeterioro de la documentación.

Materiales y métodos

1. *Recuperación microbiana:* se seleccionaron áreas representativas del depósito y en estos puntos

se realizó el muestreo ambiental por el método de sedimentación sobre agar y se tomaron mediciones de temperatura y humedad relativa. El muestreo se realizó por triplicado a intervalos de un mes, por un periodo de tres meses. La muestra documental, 90 legajos encuadernados, se seleccionaron aleatoriamente del total de población afectada correspondiente 256 legajos. Las muestras tomadas por hisopado, según los indicadores de deterioro (Figura 1), se incubaron en un caldo de recuperación (1). Alícuotas de 0.1ml del caldo se sembraron simultáneamente en placas de agar en medios primarios y en medios sólidos y líquidos con pared celular vegetal al 1% como única fuente de carbono, la cual se preparó siguiendo el procedimiento descrito por *Cooper et al.*, 1988. La identificación se llevó a cabo por microbiología tradicional y pruebas rápidas, como el BBL Crystal.

2. *Evaluación y selección preliminar de las cepas con actividades hidrolíticas:* los aislamientos de los documentos y de la atmósfera del depósito, se inocularon en medios de cultivo sólidos conteniendo como fuente única de carbono los siguientes sustratos al 1% (p/v) disueltos en solución de minerales y agar (1.5% p/v): carboximetil celulosa (CMC), xilano de hojuelas de avena (XIL), pectina de manzana (PEC), almidón (AL) y gelatina nutritiva. La inoculación se realizó siguiendo la metodología descrita por *Mikán y Castellanos* (2004). Los halos de degradación se evidenciaron adicionando como revelantes: rojo congo al 1% (p/v) para celulosa y xilano, rojo de rutenio al 0.2% (p/v) para pectina, lugol para almidón y por licuefacción de la gelatina para evaluar actividad proteolítica (2).

Se midió el diámetro de las colonias y el de los halos, producto de la degradación enzimática, de acuerdo a la fórmula: $A - B = C$; donde A es el diámetro de la colonia mas el halo de hidrólisis, B es el diámetro de la colonia y C es el resultado de la diferencia de las dos medidas. Se seleccionaron los microorganismos de acuerdo al diámetro del halo y al número de sustratos degradados.

3. *Cuantificación de las actividades hidrolíticas:* los microorganismos seleccionados se cultivaron en medios líquidos CMC, PEC y XYL al 1% (p/v) con agitación (150rpm). Cada aislamiento contó con tres frascos por cada uno de los 5 intervalos de tiempo (0, 72, 96, 120, 168 h) para hongos y actinomycetes y 10 intervalos para bacterias no filamentosas (cada 12 horas). Alícuotas de 100ul de los sobrenadantes se congelaron a -20°C , para luego cuantificar el contenido de proteínas y las actividades celulolíticas, xilanolíticas y pectinolíticas (3,4).

Las actividades accesorias acetil-esterasa, arabinofuranosidasa, xilosidasa y galactosidasa fueron determinadas por la liberación del p-nitrofenol, de los respectivos sustratos p-nitrofenil derivados (405nm), disueltos en buffer acetato de sodio 50mM, pH 5,5, utilizando una curva de p-nitrofenol en el rango de 0-5 imoles, con la que se convirtió la absorbancia a actividad en nanokatales/ml.

4. *Isoelectroenfoco y zimogramas:* se prepararon geles de IEF para analizar el perfil isoenzimático, punto isoeléctrico de los polipéptidos, en los sobrenadantes con actividades enzimáticas empleando marcadores de pI (Ampholine pH de 3 a 10, Pharmacia-Biotech) y tinciones específicas. Medios de cultivo concentrados, resuspendidos en 5 a 10ml de agua desionizada se corrieron en geles de poliacrilamida de 125x105x0.4mm en un aparato de electroforesis horizontal (LKB Bromma 2117 Multiphor, Pharmacia), el cual fue conectado a un sistema refrigerante a 6°C (MultiTem III, Pharmacia).

Las condiciones de corrido fueron: (i) precorrido a 1000V, 12mA, 12W por 30min; (ii) aplicación de muestras (1 a 10ml); (iii) corrido 1 a 2200V, 12mA, 11W por 45min; (iv) remoción de papeles de siembra; (v) corrido 2 a 2400V, 10mA, 10W por 45min y (vi) focalización a 3000V, 10mA, 10W por 30min; usando como electrolitos NaOH 1M y H_3PO_4 1M. La actividad celulolítica y xilanolítica fue detectada siguiendo el método de *Mackenzie & Williams* (1984).

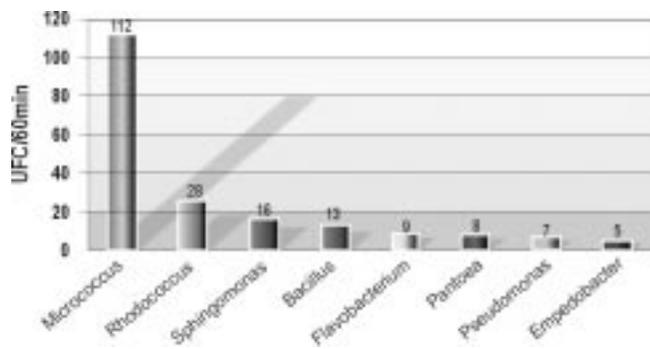


Figura 2. Frecuencia de géneros bacterianos recuperados del depósito 15 del AGN (Archivo General de la Nación)

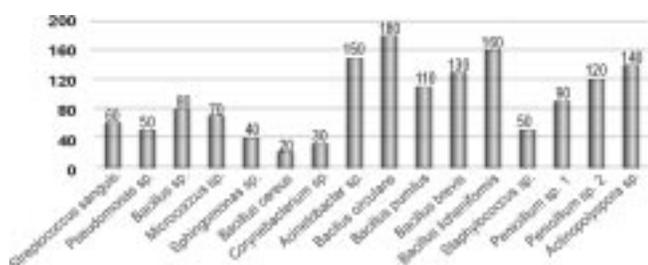


Figura 3. Frecuencia de géneros de microorganismos aislados de las unidades de conservación evaluadas

Resultados

En condiciones de temperatura y humedad relativa entre 18.8°C–20°C y 54.1%–56.5% respectivamente, se recuperaron e identificaron 12 cepas bacterianas. El género con mayor frecuencia fue *Micrococcus sp.* (112 UFC/60min), seguido de *Rhodococcus sp.* (26 UFC /60 min) y *Sphingomonas sp.* (16 UFC/ 60 min) (Figura 2).

De las unidades de conservación se recuperaron 16 aislamientos, el género *Bacillus* presentó el mayor recuento (680 UFC/ml), con 6 especies, las representativas *circulans* y *licheniformis*, con 180 UFC/ml y 160 UFC/ml respectivamente (Figura 3).

Se recuperaron dos aislamientos de *Penicillium sp.*, género que está entre los grupos más prolíficos y ubicuos de hongos y cuyas enzimas han sido muy estudiadas por su actividad ecológica en la descomposición de materiales orgánicos como el papel, la madera y textiles, entre otros. De las poblaciones recuperadas de la documentación, es de gran importancia

Tabla 1. Diámetros de los halos de degradación (cm) de las cepas bacterianas en xilano y CMC al 1%. Se muestra el promedio de tres replicas \pm D.S

Bacterias		Halos de degradación (cm)	
Celulosa	<i>Bacillus sp.1</i>	0,4	\pm 0,1
	<i>Bacillus cereus 1</i>	0,4	\pm 0,1
	<i>Bacillus circulans</i>	0,4	\pm 0,1
Xilano	<i>Bacillus sp.1</i>	0,4	\pm 0,1
	<i>Pantoea agglomerans</i>	0,2	\pm 0,1
	<i>Pseudomonas sp.1</i>	0,2	\pm 0,2

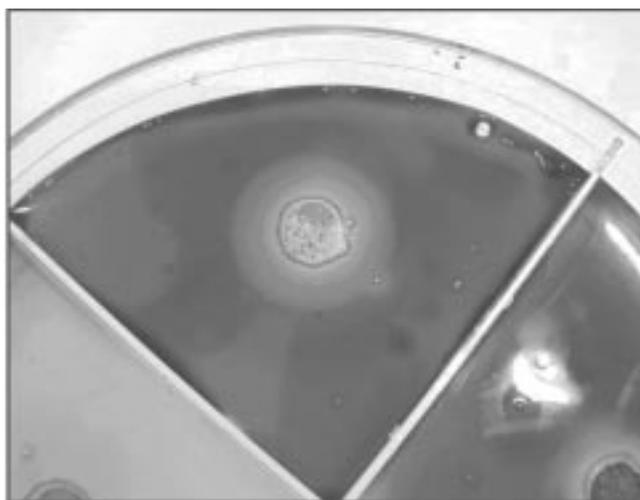


Figura 4. Halos de degradación de los hongos filamentosos en los sustratos CMC y Xilano al 1%

Actinopolyspora sp., con uno de los mayores recuentos, 140 UFC/ml.

Selección y detección de la actividad hidrolítica de los microorganismos: la evaluación semicuantitativa de las actividades hidrolíticas de las cepas bacterianas mostró que el 25% degradó alguno de los polímeros y que ninguna tuvo acción hidrolítica frente a pectina (Tabla 1).

Los hongos filamentosos y el *actinomyce* mostraron halos de hidrólisis en los tres sustratos evaluados (Figura 4). Los primeros no presentaron diferencias significativas al comparar sus diámetros de hidrólisis en CMC y XIL (5,6). Sin embargo, este grupo mostró halos significativamente mayores que *Actinopolyspora sp.* (Tabla 2).

Así mismo, se detectó actividad amilolítica en el 67.8% de los microorganismos recuperados y los

Tabla 2. Diámetros de los halos de degradación (cm) de los hongos filamentosos y *Actinopolyspora sp.* en xilano, CMC y pectina al 1%. Se muestra el promedio de tres replicas \pm D.S

Microorganismo		Halos de degradación (cm)	
Celulosa	<i>Penicillium sp.1</i>	0,7	\pm 0,1
	<i>Penicillium sp.2</i>	0,9	\pm 0,1
	<i>Actinopolyspora sp.</i>	0,5	\pm 0,1
Xilano	<i>Penicillium sp.1</i>	1,7	\pm 0,1
	<i>Penicillium sp.2</i>	1,9	\pm 0,3
	<i>Actinopolyspora sp.</i>	0,4	\pm 0,1
Pectina	<i>Penicillium sp.1</i>	0,8	\pm 0,1
	<i>Penicillium sp.2</i>	1,1	\pm 0,3
	<i>Actinopolyspora sp.</i>	0,6	\pm 0,1

aislamientos de *Bacillus* presentaron los mayores halos de degradación (1.8–2.5cm), seguidos por los aislamientos de *Micrococcus sp.*, *Penicillium sp.* y *Actinopolyspora sp.*.

Respecto de la actividad proteolítica, los géneros representativos fueron *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Penicillium sp.* y *Actinopolyspora sp.* El análisis de la actividad amilolítica y proteolítica de los microorga-

nismos, indica que los aislamientos de *Bacillus*, *Penicillium* y *Actinopolyspora* (Tabla 2). De acuerdo a la actividad hidrolítica, se seleccionaron 4 microorganismos: aislamientos No 1 y No 2 de *Penicillium*, *Bacillus sp.* y *Actinopolyspora sp.*, considerando: (i) su capacidad de degradar más de 3 sustratos y (ii) halos superiores o iguales a 0.4cm.

Cuantificación de las actividades enzimáticas de los microorganismos: los dos aislamientos de *Penicillium* y *Actinopolyspora sp.* mostraron mayor eficiencia en degradar celulosa y xilano (Figuras 5 y 6) y actividades enzimáticas accesorias; arabinofuranosidasa, xilosidasa y acetil-esterasa, para la degradación completa de los polímeros.

Tanto el aislamiento No 1 de *Penicillium sp.* como el de *Actinopolyspora sp.*, mostraron un aumento progresivo de la actividad pectinasa durante el tiempo evaluado, correlacionado con altas actividades arabinofuranosidasa

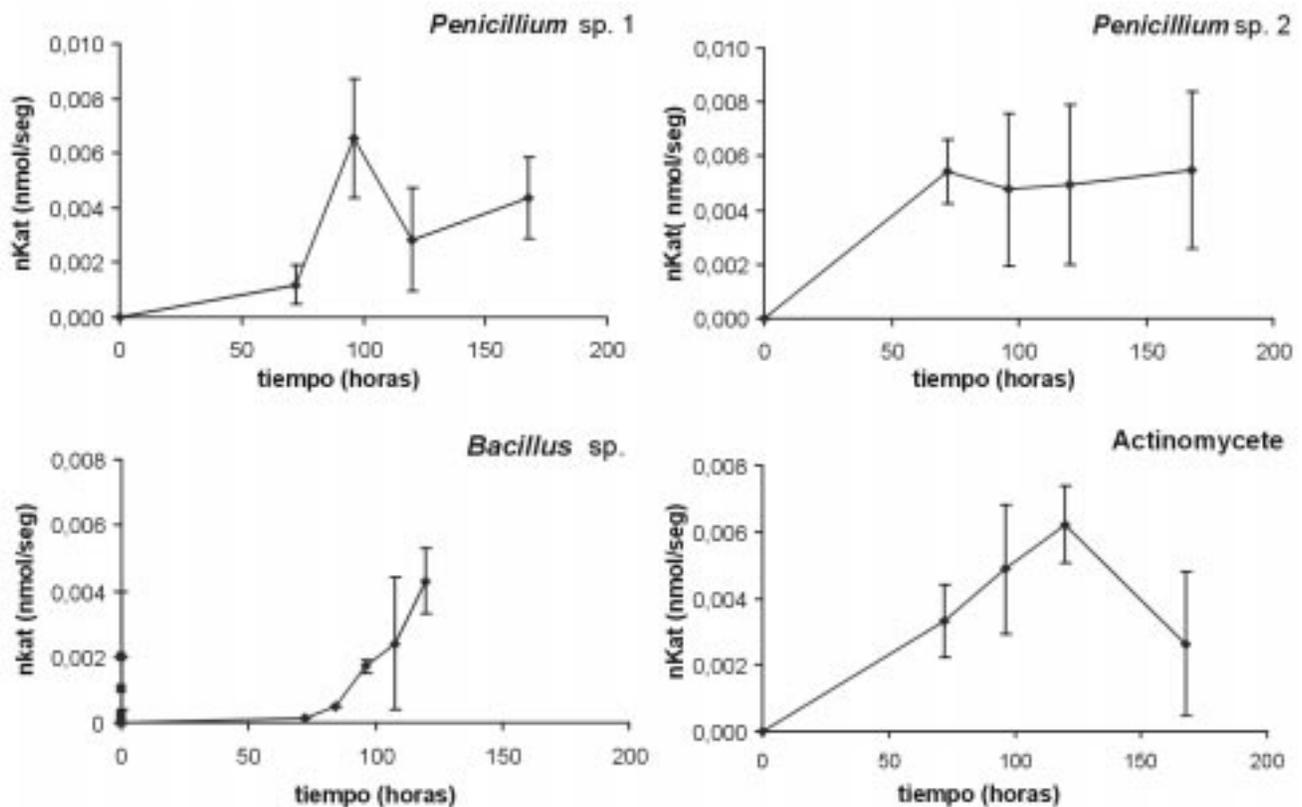


Figura 5. Actividad celulasa: *Penicillium sp.1*, *Penicillium sp.2*, *Actinopolyspora sp.* y *Bacillus sp.1* en nano moles de azúcares reductores liberados por segundo por ml (nKats/ml), durante el periodo evaluado. Las barras muestran la desviación estándar del promedio de tres replicas.

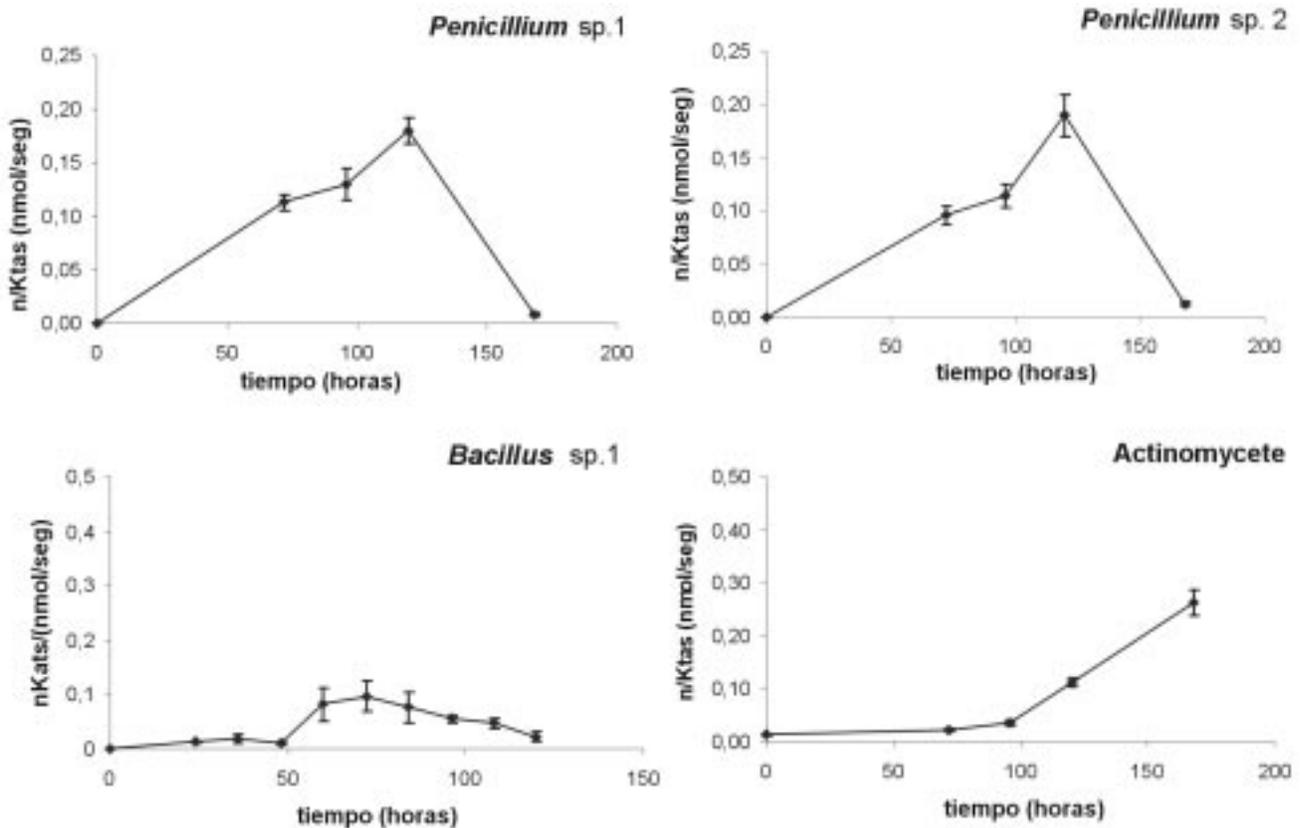


Figura 6. Actividad xilanasa para los microorganismos en nano moles de azúcares reductores liberados por segundo por ml (nKats/ml), durante el periodo evaluado. Las barras muestran la desviación estándar del promedio de tres replicas.

y galactosidasa, accesorias para la degradación completa de pectatos. Lo anterior puede sugerir que estos microorganismos, además de utilizar la celulosa, pueden degradar otros compuestos como la goma arábiga utilizada como encolante, la cual al hidrolizarse produce arabinosa, galactosa, ramnosa y ácido glucurónico, utilizados como fuente de carbono y energía.

Análisis de Isoelectroenfoco y determinación de isoenzimas con actividad celulolítica y xilanolítica: los resultados del zimograma para celulasas (Figura 7 y Tabla 3), muestran que *Penicillium* (aislamiento No.2), cuenta con un mayor número de isoformas (4). En contraste, el aislamiento No.1 mostró solo una banda con pI 4.65. En las bacterias se detectaron 2 isoformas con pI ácido.

El zimograma para xilanasas (Figura 8 y Tabla 4) muestra que el aislamiento No 2 de *Penicillium* produjo

el mayor número de bandas (5) distribuidas en todo el rango de pH. En contraste, el aislamiento No.1 mostró 2 isoformas.

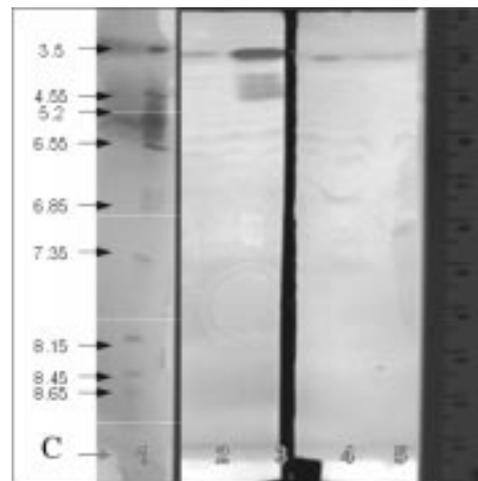


Figura 7. Zimograma para actividad celulolítica: 1.Patrones, 2 *Actinopolyspora* sp. 3. *Bacillus* sp 4. *Penicillium* sp. 1 5. *Penicillium* sp

Tabla 3. Valores de *pI* de isoenzimas con actividad celulolítica, obtenidas por interpolación en la ecuación de la recta que correlaciona las distancias desde el cátodo (mm) y los valores de *pI* de los marcadores.

Microorganismo	Distancia (mm)	<i>pI</i>
<i>Actinopolyspora</i> sp.	60	6,53
	90	4,71
<i>Bacillus</i> sp. 1	51	7,07
	91	4,65
<i>Penicillium</i> sp. 1	91	4,65
	82	5,20
<i>Penicillium</i> sp. 2	84	5,08
	86	4,96
	92	4,59

Discusión

Los parámetros ambientales de temperatura y humedad relativa para el depósito donde se realizó el estudio permanecieron entre 18.8°C – 20°C y 54.1% – 56.5% respectivamente. Los valores anteriores están dentro del rango sugerido para las condiciones climáticas en archivos (7). El género *Bacillus* presentó el mayor recuento y podría participar en el deterioro del papel, por la acción de sus enzimas celulasas y xilanasas. La mayoría de las especies descritas hidrolizan el almidón, el cual es utilizado como encolante en la fabricación del papel produciendo ácidos, los cuales con el tiempo aceleran el deterioro de la fibra celulósica (8).

Es importante destacar la presencia de los géneros *Streptococcus* sp. y *Staphylococcus* sp., por estar asociados principalmente con la piel y mucosas humanas, indicando inadecuada manipulación de los documentos.

Así mismo, se recuperaron dos aislamientos de *Penicillium* sp., género que está entre los grupos más prolíficos y ubicuos de hongos y cuyas enzimas han sido muy estudiadas por su actividad ecológica en la descomposición de materiales orgánicos como el papel, la madera y textiles, entre otros.

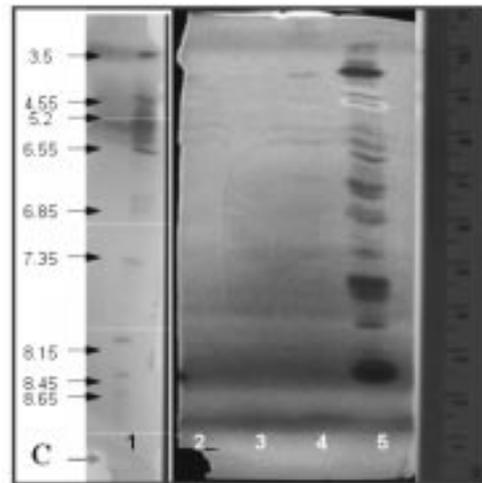


Figura 8. Zimograma para actividad xilanolítica 1. Patrones, 2 *Actinopolyspora* sp. 3. *Bacillus* sp 4. *Penicillium* sp.1 5. *Penicillium* sp.2.

De las poblaciones recuperadas de la documentación, es de gran importancia *Actinopolyspora* sp., por su conocida participación en el biodeterioro del papel dada su habilidad para penetrar los soportes, por la excreción de enzimas como amilasas, quitinasas, arabinasas, lipasas, proteasas, celulasas y hemicelulasas y por la producción de pigmentos (9).

Lo anterior corroboraría lo reportado en la literatura, donde los hongos tienen una mayor capacidad hidrolítica para degradar sustratos celulósicos. De acuerdo a los resultados obtenidos, los aislamientos de *Penicillium* sp. evaluados, fueron capaces de producir celulasas y hemicelulasas, en concordancia con lo reportado donde se destaca la importancia de los mismos, como factores bióticos importantes en el deterioro del papel (10-11).

Respecto de la actividad proteolítica, los géneros representativos fueron *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Penicillium* sp. y *Actinopolyspora* sp. El análisis de la actividad amilolítica y proteolítica de los microorganismos indica que los aislamientos de *Bacillus*, *Penicillium* y *Actinopolyspora*, por su conocido rol ecológico, pueden degradar el material fibroso y no fibroso del papel (Tabla 2), gracias a sus complejos sistemas enzimáticos.

Microorganismo	Distancia (mm)	pI
Actinomycete	17	9,13
	88	4,83
Bacillus sp. 1	87	4,89
Penicillium sp. 1	63	6,35
	89	4,77
Penicillium sp. 2	13	9,37
	27	8,52
	35	8,04
	38	7,86
	46	7,38
	48	7,25
	53	6,95
	55	6,83
	58	6,65
	60	6,53
	69	5,98
	72	5,80
	75	5,62
	81	5,26
	83	5,14
90	4,71	
92	4,59	
95	4,41	

Tabla 4. Valores de pI de isoenzimas con actividad xilanolítica, obtenidas por interpolación en la ecuación de la recta que correlaciona las distancias desde el cátodo (en mm) y los valores de pI de los marcadores.

En cuanto a la cuantificación de las actividades enzimáticas de los microorganismos, los dos aislamientos de *Penicillium* y *Actinopolyspora* sp. mostraron mayor eficiencia en degradar celulosa y xilano; indicando que los microorganismos mencionados poseen las enzimas necesarias para la degradación eficiente de los polímeros que hacen parte del material fibroso del papel.

Los resultados del zimograma para celulasas mostraron que estas degradan mas eficientemente en condiciones ácidas, dando a los microorganismos un nivel de especialización en la degradación de complejos celulósicos como es el caso del papel (4,8). De igual forma, estas características sugerirían mecanismos de protección de las enzimas celulolíticas para soportar condiciones ácidas, pues durante los

procesos de degradación del papel por los consorcios o biopelículas de microorganismos producen ácidos orgánicos, los cuales de otra manera producirían denaturación de las enzimas.

El zimograma para xilanasas muestra que el aislamiento de *Penicillium* produjo el mayor número de bandas, en contraste, el aislamiento No.1 que mostró 2 isoformas. Lo anterior sugeriría una posible especialización en la degradación de papel del aislamiento No 1, al presentar solo una isoforma celulolítica y dos xilanolíticas, a diferencia del otro aislamiento, que parece conservar características saprofiticas, relacionadas con la expresión de una cantidad de isoformas de diferente pI, concordante con la necesidad para adaptarse y colonizar en diferentes materiales lignocelulósicos (12-13).

Finalmente, el daño del material documental puede ser el resultado de una sucesión ecológica de microorganismos que en conjunto, biofilms o consorcios, potencializan el deterioro de la documentación. La participación de los microorganismos en los procesos de biodeterioro del papel esta dada en función de la composición química del material (fibroso y no fibroso), de los sistemas multienzimáticos eficientes del microorganismo para utilizar las diferentes fuentes nutricionales y de las condiciones ambientales.

El conocimiento de la microflora que participa en la degradación del soporte, facilita tomar medidas higiénico-sanitarias y permite explorar posibles potenciales de los microorganismos

Referencias

- Cooper RM, Longman D, Campbell A, Henry M, Lees PE. Enzymatic adaptation of cereal pathogens to the monocotyledonous primary wall. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 1988; 32: 33-47.
- Galiotou P, Kapantai M, Kalantzi O. Growth conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM.3488 for polygalacturonase production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1997; 47: 425-9.
- Somogy M. Notes on sugar determination. *Journal of biological chemistry* 1951; 160: 61-7.

4. Lynd L., Weimer PI, Van Zyl W, Pretorius I. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology. Reviews* 2002; 66 (3): 506-77.
5. Mackenzie CR, Williams RE. Detection of cellulase and xylanase activity in isoelectric-focused gels using agar substrate gels supported on plastic films. *Can. J. Microbiol* 1984; 30: 1522-5.
6. Mikán JF, Castellanos D. Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas parcialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2004; 6 (1): 58-71.
7. Simonet JE. Recomendaciones para la edificación de Archivos. *Archivo General de la Nación. Sistema Nacional de Archivos*; 1996. 58p.
8. Singh A, Hayashi K. Microbial Cellulases: protein architecture, molecular properties, and biosynthesis. *Advances in Applied Microbiology* 1995; 40: 1-44.
9. Kluepfel D. Screening of prokaryotes for cellulose and hemicellulose degrading enzymes. *Methods in Enzymology* 1988; 160: 180-7.
10. Stoschek CM. Increased uniformity in the response of the Coomassie Blue G protein assay to different proteins. *Analytical Biochemistry* 1990; 184:111-16
11. Sunna A, Antrainikian G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* 1997; 17 (1): 39-67.
12. Vaillant M. *Microbiología aplicada a la restauración de bienes muebles*. Bogotá; Universidad Externado de Colombia: 1999. 43p.
13. Williams ST. *Streptomyces* in Biodeterioration-their relevance, detection and identification. *International Biodeterioration and Biodegradation* 1985; 21: 201-9.

Correspondencia: revistanova@unicolmayor.edu.co